

The role of antibody in renal allograft rejection

Citation for published version (APA):

Majoer, G. D. (1981). *The role of antibody in renal allograft rejection*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19810410gm>

Document status and date:

Published: 01/01/1981

DOI:

[10.26481/dis.19810410gm](https://doi.org/10.26481/dis.19810410gm)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SUMMARY

This thesis addresses itself to the role of alloantibodies in the rejection of renal allografts in the rat. The rat was chosen since the availability of inbred strains of rats and microchirurgical techniques allow renal transplantation to be carried out in this species in a reproducible manner. The alloantigenic systems of the rat possibly involved in renal allograft rejection have been reviewed in Chapter II. The rat major histocompatibility complex includes the RT1.A and RT1.B regions — which can be compared to the HLA-A,B and HLA-D loci of man — coding for Class I and Class II antigens respectively. Class I histocompatibility antigens reside on all nucleated cells and in the rat also on erythrocytes. Hence, by infusing BN rats with LEW-E immune responses can be elicited selectively directed to LEW Class I antigens. Studies were designed in such a fashion that both the effect of unresponsiveness and responsiveness in terms of antibody production to Class I antigens on renal allograft rejection could be investigated. Thus, in contrast to the approach of others who studied the role of antibodies to donor Class I antigens on renal allograft rejection in rats by passive administration of these antibodies we actively immunized prospective renal graft recipients against donor Class I antigens. Models of active immunization appear to be more pertinent to the clinical situation for patients awaiting a renal graft may have been sensitized to donor antigens by blood transfusions, pregnancies or organ grafts.

Two major problems had to be overcome in order to sensitize rat recipients of renal allografts to donor Class I antigens prior to transplantation. The first one was of a technical nature : although rat erythrocytes express Class I antigens on their surface in the absence of Class II antigens and were therefore suitable immunogens, the erythrocytes had to be cleared of peripheral blood leukocytes. The latter possess both Class I and Class II antigens on their surface and thus might sensitize the kidney graft recipients for donor Class II antigens as well. The procedures developed for the purification of rat erythrocytes, the demonstration of the efficiency of the purification procedure — yielding erythro-

cyte suspensions containing less than one leukocyte per 1×10^8 erythrocytes — and the hemagglutination assays worked out to detect antibody formation against allogeneic rat erythrocytes represent a major part of Chapter III.

The second problem derived from the fact that rat erythrocytes had been shown by several other investigators to be non-immunogenic to allogeneic recipients. LEW-E however readily elicited hemagglutinin responses in allogeneic BN recipients. In order to exclude that we were studying an unique strain combination we extended our investigations on this subject by determining immune responsiveness to allogeneic erythrocytes in a number of different rat strain combinations and an in depth analysis of the specificity of BN anti LEW-E antibodies was made. Chapter IV describes the results of these studies which showed that both IgM and IgG hemagglutinin responses could be elicited by three consecutive infusions of 1×10^8 LEW-E into adult BN rats. Antibodies to LEW-E were shown to be directed to LEW Class I antigens and in addition to a minor alloantigenic system which could not be identified on the basis of the known alloantigenic systems of the rat. Further, these studies led to the conclusion that Class I antigens presented on congenic erythrocytes are immunogenic as shown by their capacity to elicit IgM alloantibodies. The production of IgG hemagglutinins by BN rats in response to LEW-E however appeared to be restricted to this rat strain; these IgG antibody responses were hypothesized to be brought about by synergy of donor Class I antigens and minor alloantigens acting together in stimulating the immune system of BN rats, or alternatively to be due to control by immune response gene(s) located outside the RT1 gene region.

In the course of the studies on the immunogenicity of allogeneic erythrocytes it was noticed that depending on the dose of LEW-E infused and the age of the recipient, immune responses as well as unresponsiveness in terms of antibody formation could be elicited reproducibly in BN rats. Thus, it emerged that administration of 1×10^{10} LEW-E to BN rats one month of age or a dose of 1×10^{10} LEW-E/100 g recipient weight did not elicit anti LEW hemagglutinin responses. Studies on the mechanism(s) involved in the maintenance of unresponsiveness to LEW-E in these recipients are described in Chapter V. Unresponsiveness was shown to be antigen-specific

and to be transferable to unmodified BN rats by means of T lymphocytes isolated from the spleens of LEW-E unr. BN rats. These results indicated that antigen-specific suppressor T lymphocytes were involved in the maintenance of unresponsiveness to LEW-E-associated antigens in LEW-E unr. BN rats.

Next, the effect of sensitization of prospective BN recipients of LEW kidneys with LEW-E was studied. Protocols were selected yielding BN rats actively responding to LEW-E with IgM antibody or with IgG antibody and BN rats unresponsive to LEW-E-associated antigens in terms of alloantibody production.

In Chapter VI the effect of an existing BN anti LEW-E IgM antibody response on LEW renal graft rejection is presented. Graft rejection was observed to commence at the same time in both unmodified and IgM-BN hosts but proceeded more slowly in IgM-BN rats yielding slightly prolonged survival times in these hosts. Histology of LEW grafts rejected by IgM-BN hosts was markedly different from that of LEW kidneys rejected by unmodified BN rats: the vasculonecrotic lesions usually present in the latter material were absent from 5 out of 6 kidneys rejected by IgM-BN hosts. Since absence and presence of vasculonecrotic lesions was associated with the absence or presence of anti LEW-E IgG antibody responses in this experiment IgG antibodies to Class I antigens were tentatively concluded to mediate vasculonecrotic lesions in the graft. On the other hand, it was clear that IgG antibody to donor Class I antigens did not play an obligatory role in renal allograft rejection: all LEW grafts were rejected by IgM-BN recipients within 14 days after transplantation even in the absence of anti LEW IgG hemagglutinins.

The fate of LEW kidneys inserted into IgG-BN recipients is the subject of Chapter VII. The onset of rejection of the renal allografts was found to be slightly accelerated compared to controls; also the survival of these grafts was slightly curtailed. Since vasculonecrotic lesions were noticed in kidneys rejected by IgG-BN hosts acceleration of rejection was considered to be due to a vasculitis mediated by IgG antibodies to LEW Class I antigens residing on the endothelial cells of the graft. The fact that these complement-fixing IgG antibodies failed to reject LEW kidneys in a hyperacute fashion suggested that 'help' had to be provided to the IgG antibodies to donor Class I antigens in order to cause a vasculitis. The 'help'

appeared not to be provided by cytotoxic T lymphocytes for in vitro assays showed the T lymphocyte-mediated cytotoxicity in IgG-BN hosts of LEW kidneys to be markedly reduced compared to controls when measured at the time of onset of renal allograft rejection. Which mechanism(s) constitute the 'help' we do not know but improvement of renal flow a few days post-operatively is argued to be one possibility.

Chapter VIII deals with the effect of established unresponsiveness to LEW-E-associated antigens in BN rats on the rejection of subsequently inserted LEW renal grafts. Infusion of large doses of LEW-E into BN rats prior to transplantation did not induce detectable cellular or humoral responses to LEW Class I antigens; neither the proliferative response of lymphocytes from these recipients to LEW stimulator cells in vitro was interfered with.

Survival of LEW kidneys in LEW-E unr. BN rats was markedly enhanced. Prolongation of LEW allograft survival was specific since LEW-E unr. BN rats rejected WISTAR renal allografts acutely. Cytotoxic antibody responses to LEW Class II antigens and the cytotoxic T cell response to LEW Class I antigens were identical in LEW-E unr. and unmodified BN hosts of LEW kidneys. However, LEW kidneys did not 'break' humoral unresponsiveness to LEW-E-associated antigens in LEW-E unr. BN hosts suggesting antibodies to these antigens to play an important role in the rejection of LEW renal allografts. This assumption was corroborated by the finding that WISTAR kidneys elicited anti WISTAR hemagglutinins in LEW-E unr. BN rats.

Taken together, the results from this study indicate antibodies to donor Class I antigens to play an obligatory role in the acute rejection of LEW renal grafts by BN recipients. IgG antibodies to donor Class I antigens appear to be most effective by mediating a necrotizing vasculitis in the graft. However, (delayed) rejection of LEW kidneys by IgM-BN rats in the absence of IgG antibody to donor Class I antigens suggests IgM antibodies with this specificity to be effective as well, albeit not by the induction of vasculonecrotic lesions. A role for cytotoxic T cells and antibody to donor Class II antigens in delayed rejection of LEW renal grafts by IgM-BN rats has not been formally excluded but is unlikely since LEW kidneys inserted into LEW-E unr. BN rats enjoyed a markedly prolonged survival in spite of the fact that these host-versus-graft responses were not influenced in these recipients.

SAMENVATTING

Het onderzoek gepresenteerd in dit proefschrift heeft tot doel de rol op te helderen die antilichamen spelen bij de afstoting van niertransplantaten door ratten. De rat werd als proefdier gekozen omdat, dank zij het beschikbaar zijn van ingeteelde rattenstammen en mikrochirurgische technieken, in deze diersoort niertransplantaties op een reproduceerbare wijze kunnen worden verricht. De alloantigene systemen van de rat die een rol zouden kunnen spelen bij de afstoting van niertransplantaten zijn samengevat in een literatuuroverzicht (Hoofdstuk II). Hierin wordt o.a. beschreven dat het belangrijkste complex van genen die coderen voor de histocompatibiliteits-antigenen (MHC) in de rat ten minste twee gebieden omvat : het RTI.A en het RTI.B gebied. Deze gebieden zijn vergelijkbaar met de HLA-A,B en HLA-D loci van de mens en coderen respectievelijk voor Klasse I en Klasse II antigenen. Klasse I histocompatibiliteits-antigenen komen voor op alle kernhoudende cellen en bij de rat ook op erythrocyten. In BN ratten kunnen dus, door LEW-E intraveneus in te spuiten, antilichamen worden opgewekt welke tegen Klasse I antigenen gericht zijn maar niet tegen Klasse II antigenen, daar deze niet op de erythrocyt voorkomen. Het onderzoek werd zó opgezet dat zowel het effect van reaktiviteit als van non-reaktiviteit met betrekking tot antilichaamproduktie op de afstoting van niertransplantaten kon worden onderzocht. Dus in tegenstelling tot de benadering van anderen die de rol van antilichamen tegen donor Klasse I antigenen bij de afstoting van niertransplantaten bestudeerden door deze antilichamen passief toe te dienen hebben wij toekomstige ontvangers actief tegen Klasse I antigenen gesensitiseerd. Modellen waarin actieve immunisatie wordt toegepast sluiten beter aan op de klinische situatie waarin patienten in afwachting van een niertransplantaat gesensitiseerd kunnen worden tegen donor Klasse I antigenen door bloedtransfusies, zwangerschappen of orgaantransplantaten.

Twee belangrijke problemen moesten overwonnen worden om ontvangers van allogene niertransplantaten vóór transplantatie te kunnen sensibiliseren tegen donor Klasse I antigenen. Het eerste

was van technische aard : de erythrocyten die gebruikt werden voor immunisaties dienden geen leukocyten te bevatten aangezien deze laatsten zowel Klasse I als Klasse II antigenen op hun oppervlak hebben en derhalve de ontvangers van niertransplantaten ook tegen Klasse II antigenen zouden kunnen sensibiliseren. De procedures die ontwikkeld werden voor de zuivering van ratte-erythrocyten, het aantonen van de efficiëntie van de zuiveringsprocedure — die erythrocytensuspensies opleverde met minder dan 1 leukocyt per 1×10^8 erythrocyten — en de hemagglutinatie technieken die werden uitgewerkt om antilichaamvorming tegen allogene ratte-erythrocyten te kunnen aantonen maken een belangrijk deel uit van Hoofdstuk III.

Het tweede probleem vond haar oorzaak in het feit dat verschillende andere onderzoekers hadden aangetoond dat ratte-erythrocyten niet immunogeen waren voor allogene ontvangers. LEW-E riepen evenwel hemagglutinine-responsen op in allogene BN ontvangers. Om uit te sluiten dat een unieke combinatie van stammen werd gebruikt breidden we ons werk op dit gebied uit door het immunologisch reactievermogen tegen allogene erythrocyten in een aantal verschillende combinaties van rattestammen te bepalen en door de specificiteit van BN anti LEW-E antilichamen nader te analyseren. Hoofdstuk IV beschrijft de resultaten van deze onderzoeken welke aantoonde dat zowel IgM als IgG hemagglutinine-responsen konden worden opgewekt door volwassen BN ratten drie maal opeenvolgend intraveneus in te spuiten met 1×10^8 LEW-E. Antilichamen tegen LEW-E bleken tegen LEW Klasse I antigenen gericht te zijn en bovendien tegen een alloantigeen systeem dat niet geïdentificeerd kon worden als één van de bekende alloantigene systemen in de rat. Verder leidde dit onderzoek tot de konklusie dat Klasse I antigenen gepresenteerd op congene erythrocyten immunogeen zijn, zoals bleek uit hun vermogen IgM alloantilichamen op te wekken. De produktie van IgG antilichamen door BN ratten tegen LEW-E leek echter specifiek voor de BN stam; van deze IgG antilichaam-respons wordt verondersteld dat deze teweeg gebracht wordt door synergie van donor Klasse I antigenen en 'minor' alloantigenen bij gelijktijdige stimulatie van het immuunsysteem van BN ratten of, als alternatief, dat IgG antilichaam-produktie onder controle staat van 'immuun-respons genen' die buiten het gebied van de RT1 genen gelegen zijn.

Tijdens het bestuderen van de immunogeniciteit van allogene erythrocyten viel op dat, afhankelijk van de hoeveelheid LEW-E die werd geïnfundeed en van de leeftijd van de ontvanger, reproduceerbaar zowel antilichamen konden worden opgewekt alsook een onvermogen om met antilichamen te reageren. Zo werd gevonden dat toediening van 1×10^{10} LEW-E aan één maand oude BN ratten, of een hoeveelheid van 1×10^{10} LEW-E/100 g lichaamsgewicht aan volwassen BN ontvangers, geen anti LEW hemagglutinine respons opwekte. Onderzoeken naar het mechanisme(n) betrokken bij het in stand houden van de non-reaktiviteit tegen LEW-E in deze ontvangers zijn beschreven in Hoofdstuk V. Aangetoond werd dat dit niet-reageren antigeen-specifiek was en dat het middels T lymfocyten geïsoleerd uit de milten van LEW-E unr. BN ratten overdraagbaar was aan onbehandelde BN ratten. Deze resultaten gaven aan dat antigeen-specifieke suppressor T lymphocyten betrokken waren bij het in stand houden van de non-reaktiviteit tegen LEW-E-geassocieerde antigenen in LEW-E unr. BN ratten.

Vervolgens werd het effect van sensibilisatie van toekomstige BN ontvangers van LEW nieren met LEW-E bestudeerd. Protokollen werden gekozen waarmee BN ratten konden worden verkregen die actief reageerden tegen LEW-E door produktie van IgM antilichamen of IgG antilichamen dan wel een specifiek onvermogen vertoonden om met antilichamen tegen LEW-E te reageren.

In Hoofdstuk VI wordt het effect van een bestaande BN anti LEW-E IgM antilichaamrespons op de afstoting van LEW niertransplantaten gepresenteerd. Gekonstateerd werd dat transplantaat-afstoting terzelfder tijd begon in onbehandelde en IgM-BN gastheren maar dat deze langzamer verliep in IgM-BN ratten, wat in enigszins verlengde overlevingstijden in deze gastheren resulteerde. De histologie van LEW nieren welke waren afgestoten door IgM-BN gastheren verschilde van die van LEW nieren afgestoten door onbehandelde BN ratten : de fibrinoïde necrose van de arteriën, glomerulaire lis necrose en lokale nierschorsnecrose welke gewoonlijk aanwezig waren in het laatstgenoemde materiaal waren afwezig in 5 van de 6 nieren die werden afgestoten door IgM-BN gastheren. Daar de aanwezigheid en afwezigheid van deze 'vasculonecrotische laesies' in dit experiment samen viel met de aanwezigheid of afwezigheid van anti LEW-E IgG antilichamen werd gekoncludeerd dat IgG antilichamen tegen Klasse I antigenen mede de

'vasculo-necrotische laesies' in het transplantaat teweeg brengen. Het was ook duidelijk dat IgG antilichamen tegen donor Klasse I antigenen geen vereiste zijn voor de afstoting van een allogeen niertransplantaat : alle LEW nieren werden door IgM-BN ontvangers binnen 14 dagen afgestoten ook als er geen anti LEW IgG hemagglutinenen aanwezig waren.

Het lot van LEW nieren geïmplantéerd in IgG-BN ontvangers is het onderwerp van Hoofdstuk VII. Het begin van de afstoting van de allogene niertransplantaten viel, in vergelijking met kontrôles, wat vroeger; ook was de overleving van deze transplantaten enigszins verkort. Omdat 'vasculo-necrotische laesies' werden opgemerkt in nieren welke door IgG-BN gastheren waren afgestoten werd aangenomen dat de versnelde afstoting het gevolg was van een vasculitis veroorzaakt door IgG antilichamen tegen LEW Klasse I antigenen welke vóórkomen op de endotheliale cellen in het transplantaat. Het feit dat deze complement-bindende IgG antilichamen niet in staat waren tot hyperakute afstoting van LEW nieren was een aanwijzing dat 'hulp' moest worden geboden aan de IgG antilichamen tegen Klasse I antigenen teneinde een vasculitis te veroorzaken. 'Hulp' leek niet geboden te worden door cytotoxische T lymphocyten daar uit in vitro bepalingen bleek dat de cytotoxiciteit teweeg gebracht door T lymphocyten in IgG-BN gastheren opmerkelijk verlaagd was ten opzichte van kontrôles wanneer deze gemeten werd ten tijde van het begin van de afstoting van de niertransplantaten. Welk mechanisme(n) hulp verleent is niet duidelijk maar argumenten worden aangedragen die verbetering van de doorstroming van de nier enkele dagen na transplantatie als één der mogelijkheden aangeven.

Hoofdstuk VIII behandelt het effect van een bestaande non-reaktiviteit tegen LEW-E-geassocieerde antigenen in BN ratten op de afstoting van LEW nieren die naar deze ratten getransplanteerd werden. Infusie van grote hoeveelheden LEW-E in BN ratten vóór transplantatie riep geen aantoonbare cellulaire of humorale reacties tegen LEW Klasse I antigenen op; ook de proliferatieve respons van lymphocyten van deze ontvangers tegen LEW stimulator cellen in vitro werd er niet door beïnvloed.

De overleving van LEW nieren in LEW-E unr. BN ratten was opmerkelijk verlengd. De verlenging van de overleving van de LEW allogene transplantaten was specifiek, aangezien LEW-E unr. BN

ratten allogene WISTAR niertransplantaten akuit afstootten. De cytotoxische antilichaam respons tegen LEW Klasse II antigenen en de cytotoxische T cel respons tegen LEW Klasse I antigenen waren identiek in LEW-E unr. en onbehandelde BN gastheren van LEW nieren. De humorale non-reaktiviteit tegen LEW-E-geassocieerde antigenen in LEW-E unr. BN gastheren werd door LEW nieren echter niet 'doorbroken', wat aannemelijk maakte dat antilichamen tegen deze antigenen een belangrijke rol spelen in de afstoting van LEW niertransplantaten. Deze veronderstelling werd gesteund door de waarneming dat WISTAR nieren wel anti WISTAR hemagglutinenen opwekten in LEW-E unr. BN ratten.

Tesamen genomen duiden de resultaten van deze studie er op dat antilichamen tegen Klasse I antigenen van de donor een vereiste zijn voor de akute afstoting van LEW niertransplantaten door BN ontvangers. IgG antilichamen tegen donor Klasse I antigenen lijken het meest effectief te zijn in dit opzicht doordat deze een necrotiserende vasculitis in het transplantaat teweeg brengen. De (vertraagde) afstoting van LEW nieren door IgM-BN ratten in de afwezigheid van IgG antilichamen tegen Klasse I antigenen van de donor duidt er echter op dat IgM antilichamen die deze specificiteit bezitten ook effectief zijn, alhoewel niet door het veroorzaken van 'vasculo-necrotische laesies'. Een rol voor cytotoxische T cellen en antilichamen tegen donor Klasse II antigenen in de vertraagde afstoting van LEW niertransplantaten door IgM-BN ratten werd formeel niet uitgesloten maar is onwaarschijnlijk, omdat LEW nieren welke in LEW-E unr. BN ratten geïmplantéerd werden een opmerkelijk verlengde overleving ten deel viel ondanks het feit dat deze reacties van de gastheer tegen het transplantaat in deze ontvangers niet werden beïnvloed.